Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Über Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine

Radio-Cyanocobalamin-bindende Glykoproteine aus Normal- und Leukämikerserum und aus Normal- und Leukämikerurin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerd Haffner
aus Speyer/Rhein

1969

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Über Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine

Radio-Cyanocobalamin-bindende Glykoproteine aus Normal- und Leukämikerserum und aus Normal- und Leukämikerurin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerd Haffner
aus Speyer/Rhein

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
(Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. A. Gottschalk

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

I. Einleitung 1

II. Methoden 3

Übersicht über die verschiedenen Arbeitsgänge 3

A. Fraktionierte Ammonsulfatfällung 4

B. Dialyse und Lyophilisieren der Sedimente "1c" bis "10c" aus

1. Normalserum 5

2. CML-Serum 6

C. Papierelektrophorese und Autoradiographie 6

D. Säulenchromatographie 6

Durchführung der Säulenchromatographie .. 8

E. Immunelektrophoresen und Geldiffusionsteste nach OUCHTERLONY mit Autoradiographie 9

III. Ergebnisse 10

A. Ammonsulfatfällung, Dialyse und Lyophilisieren der Sedimente "7c" bis "10c" 10

1. Normalserum 10

2. CML-Serum 11

B. Papierelektrophorese und Autoradiographie 11

C. Säulenchromatographie 12

1. Normalserum 13

2. CML-Serum 14

Seite

D. Immunelektrophorese 15

E. Geldiffusionsteste nach OUCHTERLONY 15

IV. Diskussion 18

V. Zusammenfassung 22

VI. Literaturverzeichnis 24

Anhang: Abb. 1...6 35

I. E I N L E I T U N G

Die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität des Blutserums (ROSS 1950; MOLLIN u. ROSS 1952; HEINRICH u. LAHANN 1954; MOLLIN et al. 1956; BERTCHER u. MEYER 1957; Literaturübersichten bei WIJ= MENGA 1956; BENNHOLD u. OTT 1961 und SIMONS 1964) beträgt bei Normalpersonen etwa 2-3 ng/ml (MILLER 1958).Bei Patien= ten,die an chronisch-myeloischer Leukämie (=CML) leiden,ist die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität erhöht (BEARD et al. 1954; MOLLIN u. ROSS 1955; THOMAS u. ANDERSON; ERDMANN-OEHLECKER 1956; MEYER et al.; RACCUGLIA u. SACKS; RACHMILEWITZ et al. 1957; COOPER; MOLLIN; WEINSTEIN et al. 1959; BRODY et al.; HALSTED; HALL; RITZ u. MEYER 1960; JAWORKOWSKY u. MAY; KURLOV 1961; GROSSOWICZ et al. 1962; KAHN; RETIEF et al. 1965). Es können bis 25 ng Vitamin B_{12} pro ml CML-Serum gebunden werden (MILLER 1958). Radioaktives Vitamin B_{12} wird im Humanserum vor allem gebunden an Albumin (CLAUSEN u. MUNKNER 1962; KALLEE et al. 1964) und an ein saures Alpha-1-Seromucoid (BEARD et al.; OSTROWSKI et al.; PITNEY et al. 1954; FAHEY et al.; MENDELSOHN et al. 1958; MILLER u. SULLIVAN; WEINSTEIN et al. 1959; KALLEE 1962; HALL u. FINKLER; HERBERT et al.; KALLEE et al. 1964; GABUZDA et al.; ROSENTHAL et al. 1965; RETIEF et al. 1966; BAKER et al.; RETIEF et al. 1967; zu Nomenklaturfragen siehe SCHULTZE 1964).

Nach neueren Untersuchungen sollen zwei Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine im menschlichen Serum vorkommen: Transcobala= min I (=TC I),ein Alpha-1-Globulin,soll das endogene Vitamin B_{12} (=B_{12}) binden,während Transcobalamin II (=TC II),das zu den Beta-Globulinen gehört,oral oder parenteral zugeführtes B_{12} bindet (FINKLER 1963,1964 und 1965; HOM et al.; LAWRENCE 1966; HOM 1967). Die Halbwertszeit des Schwundes von B_{12},das an TC II gebunden ist,beträgt weniger als 24 Stunden (HOM et al. 1966). In vivo wird B_{12} zuerst an TC II gebunden und geht nach einigen Stunden an TC I über (HALL u. FINKLER 1964, 1965; HOM et al.; LAWRENCE 1966). In vitro zeigt TC II eine höhere B_{12}-Bindungskapazität als TC I (LAWRENCE 1966).

Als Grund für die größere B_{12}-Bindungskapazität von CML-Seren wird eine gegenüber Normalseren erhöhte Menge an Seromucoid

angenommen (MILLER u. SULLIVAN 1959) oder die größere B_{12}-Bindungskapazität auf einen abnormen Stoffwechsel des Seromucoids zurückgeführt (MENDELSOHN et al. 1958). Die erhöhte B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums beruht jedoch nicht auf einem "overflow"-Effekt (MILLER u. SULLIvan; WEINSTEIN et al. 1959), sondern auf einer spezifischen Bindung (BEAL 1967).
Leukozyten enthalten ebenfalls ein B_{12}-bindendes Glykoprotein (THOMAS u. ANDERSON 1956; KALLEE et al. 1964). Eine Suspension von 10^7 lysierten Leukozyten bindet etwa 9 ng B_{12} (SIMONS 1964). Es können Beziehungen bestehen zwischen B_{12}-Bindungskapazität im Serum und Gesamtleukozytenzahl (RACCUGLIA u. SACKS 1957; GOTTLIEB et.al. 1966).
Auch im menschlichen Urin kommen Glykoproteine vor (ANDERSON et al. 1955; MACLAGAN u. ANDERSON 1958; WINZLER 1960; SCHEURLEN 1961; DISCHE; BLIX 1964). Davon können einige B_{12} binden. Diese weisen im CML-Harn eine erhöhte B_{12}-Bindungskapazität auf (MILLER u. SULLIVAN 1959; WEINSTEIN u. WATKIN 1960; KALLEE 1962; KALLEE et al. 1964; CASTRILLON-OBERNDORFER et al.; KALLEE et al.; KARYPIDIS et al.; AFSCHAR et al. 1966).
Es gelang, bei Kaninchen Antikörper zu produzieren, die besonders die B_{12}-bindenden Komponenten aus Serum und Urin präzipitierten (KALLEE et al. 1964; KARYPIDIS 1966).

Der vorliegenden Arbeit lag die Frage zugrunde, ob die B_{12}-bindenden Glykoproteine des Serums identisch sind mit den B_{12}-bindenden Uroglykoproteinen.

II. M E T H O D E N

Übersicht über die verschiedenen Arbeitsgänge:

A. Mischseren von Normalpersonen und Mischseren von CML-Patienten wurden mittels fraktionierter Ammonsulfatfällung und pH-Änderungen aufgearbeitet, im Prinzip nach den von WEIMER et al. (1950) sowie von WEINSTEIN et al. (1959) angegebenen Verfahren, meist in Anlehnung an die Modifikationen von KALLEE et al. (1964).

B. Die bei den einzelnen Fällungsschritten erzielten Sedimente wurden teils mit ^{57}Co-, teils mit ^{60}Co-markiertem Radiocyanocobalamin inkubiert, dialysiert und anschliessend lyophilisiert.

C. Untersuchungen mittels Papierelektrophorese und Autoradiographie schlossen sich an.

D. Eine weitere Reinigung der spezifischen B_{12}-bindenden Komponenten wurde säulenchromatographisch mit DEAE-Sephadex A-50 durchgeführt.

E. Aufschluß über immunologisches Verhalten der B_{12}-bindenden Glykoproteine aus Serum und Urin ließ sich mittels Immunelektrophorese und Agar-Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY erzielen, teilweise in Verbindung mit autoradiographischen Untersuchungen.

A. FRAKTIONIERTE AMMONSULFATFÄLLUNG

Die Isolierung der B_{12}-bindenden Glykoproteine aus Normal= serum und aus CML-Serum geschah nach folgendem Schema:

1a) 275 ml Serum mit 225 ml Ammonsulfatlösung (4,0-molar, pH 3,5) auf 1,8-m-Ammonsulfat (=AS) -Konzentration bringen.

b) Suspension "1a" 20 min. bei ca. 3 500 Upm (etwa 100 g) zentrifugieren. Sediment mit insgesamt 80 ml 1,8-m-AS-Lösung (pH 3,5) waschen.

c) Vereinigen der Überstände "1b". Sediment in genügend physiologischer NaCl-Lösung suspendieren und in Tief= kühltruhe aufbewahren.

2a) 550 ml Überstand "1c" mit 14,6 g AS-Trockensubstanz auf 2,0-m-AS-Konzentration bringen.

b) Suspension "2a" zentrifugieren,Sediment mit 40 ml 2,0-m-AS-Lösung (pH 3,5) waschen.

c) Vereinigen der Überstände;Sediment wie unter "1c".

3a) 575 ml Überstand "2c" mit 15,4 g AS-Trockensubstanz auf 2,2-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren;waschen mit 40 ml 2,2-m-AS-Lösung (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

4a) 600 ml Überstand "3c" mit 15,9 g AS-Trockensubstanz auf 2,4-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren;waschen mit 50 ml 2,4-m-AS-Lösung (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

5a) 630 ml Überstand "4c" mit 16,6 g AS-Trockensubstanz auf 2,6-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren;waschen mit 40 ml 2,6-m-AS-Lösung (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

6a) 645 ml Überstand "5c" mit ca. 10 ml 2n Schwefelsäure auf pH 3,5 einstellen (Glaselektrode) und mit 21 g AS-Trockensubstanz auf 2,8-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren; waschen mit 35 ml 2,8-m-AS-Lösung (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

7a) 680 ml Überstand "6c" mit 18,0 g AS-Trockensubstanz auf 3,0-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren; waschen mit 10 ml 3,0-m-AS-Lösung. (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

8a) 685 ml Überstand "7c" mit 18,0 g AS-Trockensubstanz auf 3,2-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren; waschen mit 5 ml 3,2-m-AS-Lösung (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

9a) 680 ml Überstand "8c" mit 18,0 g AS-Trockensubstanz auf 3,4-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren; waschen mit 5 ml 3,4-m-AS-Lösung (pH 3,5).

c) Wie unter "1c".

10a) 675 ml Überstand "9c" mit 17,8 g AS-Trockensubstanz auf 3,6-m-AS-Konzentration bringen.

b) Zentrifugieren.

c) Überstand und Sediment getrennt in Tiefkühltruhe aufbewahren.

B. DIALYSE UND LYOPHILISIEREN DER BEI DER AMMONSULFAT-FÄLLUNG GEWONNENEN SEDIMENTE "1c" BIS "10c"

1. Normalserum

Von den in physiologischer NaCl-Lösung suspendierten Sedimenten "1c" bis "10c" wurden nach Neutralisation mit 8,5%igem NH_4OH jeweils 4 ml mit 50 nCi $^{57}CoB_{12}$ eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, dann drei Tage gegen jeweils 2 l einer zweimal täglich gewechselten Lösung von 0,01% Cialit bei ca. 5-8°C dialysiert. Anschließend wurde der Inhalt der Dialysierschläuche lyophilisiert, die erhaltene Substanzmenge gewogen und ihre Impulsrate/min. bestimmt (Bohrlochkristall eines Scintillations-Ringschalenzählers, Frieseke & Hoepfner, Erlangen). Die Impulsrate/min. wurde jeweils auf 1 mg Substanz umgerechnet.

2. CML-Serum

Von den in physiologischer NaCl-Lösung suspendierten Sedimenten "1c" bis "6c" wurden nach Neutralisation mit 8,5%igem NH_4OH jeweils 2 ml mit 50 nCi $^{57}CoB_{12}$ inkubiert. Da bei den Sedimenten "7c" bis "10c" 50 nCi (entspricht 50 ng) $^{57}CoB_{12}$ nicht genügten, um die Bindungskapazität dieser Sedimente voll abzusättigen, wurden sie mit 100 nCi $^{57}CoB_{12}$ inkubiert. Nach Dialyse und Lyophilisieren wurden die Impulsraten/min. bestimmt und auf jeweils 1 mg Substanz bezogen.

C. PAPIERELEKTROPHORESE UND AUTORADIOGRAPHIE

Sowohl von den Normalsedimenten "1c" bis "10c", als auch von den CML-Sedimenten "1c" bis "10c" wurden jeweils 0,3 ml mit 20 nCi $^{60}CoB_{12}$ inkubiert, drei Tage gegen 0,01%ige Cialitlösung dialysiert und anschließend lyophilisiert. Danach wurden von jedem Sediment 4%ige Lösungen in Veronalpuffer hergestellt und von diesen Lösungen jeweils 40 Mikroliter auf die Elektrophoresepapierstreifen aufgetragen. Die Laufzeit betrug 18 Stunden bei 150 V und 9 mA. Die getrockneten Papierstreifen wurden auf Röntgenfilm geklebt und die Filme in Röntgenkassetten der Selbstbelichtung überlassen. Die Expositionszeit betrug fünf Monate. Danach wurden die Papierstreifen mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

D. SÄULENCHROMATOGRAPHIE

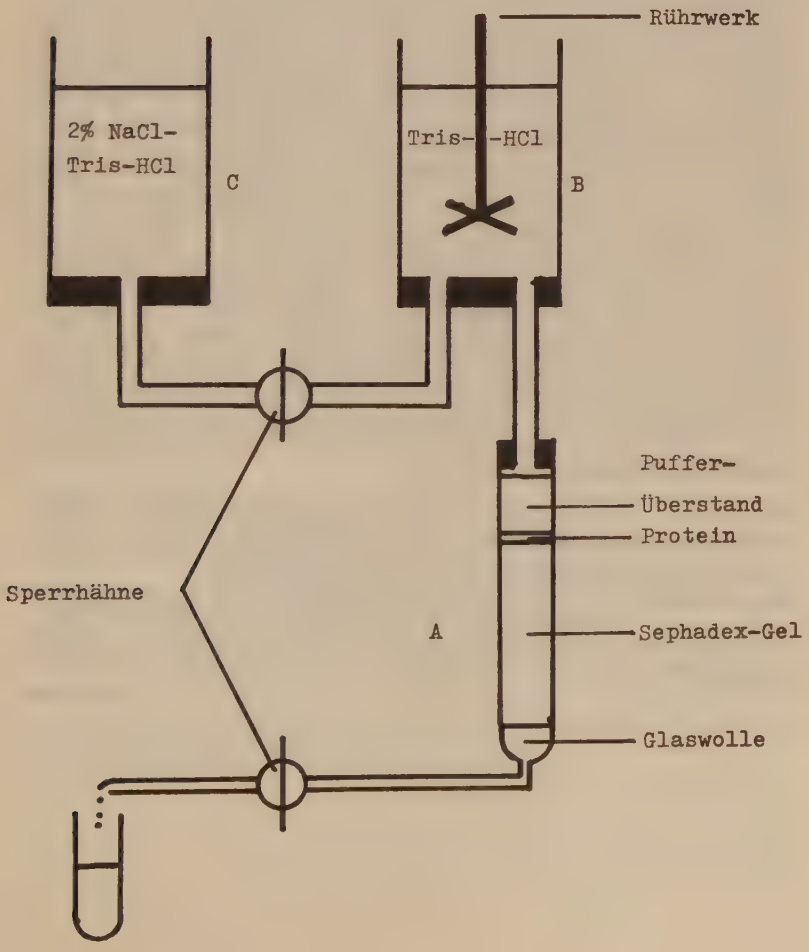
Die Säulenchromatographie wurde mit DEAE-Sephadex A-50 in Tris-HCl-Puffer durchgeführt. Als Elutionsmittel diente Tris-HCl-Puffer mit kontinuierlich bis 2% ansteigendem NaCl-Gradienten.

Tris-HCl-Puffer:

24,2 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan mit Aq. dest. auf 1 l auffüllen. Davon 500 ml mit 80 ml 1n-HCl versetzen und mit Aq. dest. auf 2 l auffüllen. Dies entspricht einer etwa 0,05-molaren Tris-HCl-Pufferlösung mit pH 7,5.

DEAE-Sephadex A-50-Gel:
3 g DEAE-Sephadex A-50 wurden in 200 ml Tris-HCl-Puffer aufgeschwemmt und so lange mit Tris-HCl-Puffer gewaschen, bis der pH-Wert konstant bei 7,5 blieb.

Schema der Versuchsanordnung:



Durchführung der Säulenchromatographie:
Säule A (Innendurchmesser 2,0 cm) wurde ca. 8 cm hoch über der Glaswolle mit Sephadex-Gel gefüllt. Darüber wurden mehrere cm Überstand (Puffer) belassen und die Proteinlösungen von Normalpersonen und CML-Patienten (Sedimente "7c" bis "10c", pro Lauf ca. 25 mg Protein) durch Unterschichten auf die Geloberfläche aufgetragen. Glaszylinder B wurde mit 150 ml Tris-HCl-Puffer gefüllt, Glaszylinder C (gleicher Innendurchmesser wie Glaszylinder B) mit 150 ml einer 2%igen NaCl-Tris-HCl-Pufferlösung (2 g NaCl in 150 ml Tris-HCl-Puffer). Der Durchfluß wurde auf etwa 20 ml pro Stunde eingestellt. Die Eluate wurden automatisch in Portionen zu je 5 ml aufgefangen (LKB Radi Rac Fraction Collector mit Syphon) und anschließend die Impulsrate/0,4 min. in den einzelnen Reagenzgläschen gemessen. Der "peak" eines jeden Laufes (Gläschen mit den höchsten Impulsraten) verteilte sich meist über 5 Gläschen mit je 5 ml Inhalt. Der Inhalt der "peak"-Gläschen wurde vereinigt und nach dem Dialysieren lyophilisiert. Um Substanzverluste zu vermeiden, wurde schrittweise durch Volumeneinengung lyophilisiert (mehrmaliges Einfrieren, Teillyophilisieren, Auftauen und erneutes Einfrieren). Mit den 5 Gläschen vor dem "peak" und den 5 Gläschen nach dem "peak" wurde ebenso verfahren.
Nach dem Lyophilisieren wurden die Impulsraten/min. der jeweiligen Trockensubstanzen bestimmt und die B_{12}-Bindungskapazitäten pro mg Substanz berechnet.
Diese Lyophilisate dienten als Antigene bei den nachfolgenden Immunelektrophoresen und Geldiffusionstesten nach OUCHTERLONY.

E. IMMUNELEKTROPHORESEN UND AGAR-GELDIFFUSIONSTESTE NACH OUCHTERLONY MIT ANSCHLIESSENDER AUTORADIOGRAPHIE

Von den Trockensubstanzen derjenigen Glykoproteinfraktionen der Sedimente "7c" bis "10c", die nach der Säulenchromatographie die höchsten $^{57}CoB_{12}$-Bindungskapazitäten aufwiesen, wurden 3%ige Lösungen hergestellt, die pro ml 50 nCi $^{60}CoB_{12}$ enthielten. Als Elektrophoresemedium diente Agargel mit 1,5 g Special Agar Noble (Difco, Detroit) in 100 ml 1:5 verdünntem Veronalpuffer (pH 8,6). Die Laufzeit betrug für einen Ansatz von sechs Objektträgern zwei Stunden bei 150 V und 15 mA. Als Antikörper dienten die von KALLEE und von KARYPIDIS hergestellten Kaninchenvollseren gegen CML-Uroglykoproteine. 15 bis 20 Stunden nach Zufügen des Antikörpers waren die Präzipitationssicheln optimal ausgebildet und wurden im Direktverfahren fotografiert (siehe "Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik", Behringwerke, Mai 1964, S. 22). Anschließend wurden die Objektträger 10 Stunden in eine Lösung von 0,9% NaCl + 0,01% Cialit und danach 2 Tage in destilliertes Wasser gelegt, um überschüssiges $^{60}CoB_{12}$ auszuwaschen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger auf Röntgenfilme geklebt und die Filme in Röntgenkassetten der Selbstbelichtung überlassen. Die Expositionszeit betrug im allgemeinen 10 Wochen.

Für die Geldiffusionsteste nach Ouchterlony wurden 4 g Agar in einer Mischung von 100 ml 0,15-molarer Phosphatpufferlösung (pH 7,1) und 300 ml Aq. dest. mit Zusatz von 0,05 g Cialit gelöst. Die Expositionszeit bei der Autoradiographie betrug hier im allgemeinen 3 bis 5 Wochen. Nach der Autoradiographie wurden sowohl die Agarplatten der Immunelektrophoresen als auch die der Geldiffusionsteste mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

III. E R G E B N I S S E

A. AMMONSULFATFÄLLUNG, DIALYSE UND LYOPHILISIEREN DER SEDIMENTE "7c" BIS "10c"

Der Hauptanteil der Vitamin B_{12}-bindenden Glykoproteine fällt sowohl beim Normalserum als auch beim CML-Serum zwischen 3,0- und 3,6-molarer Ammonsulfatkonzentration aus, wenn bei pH 3,5 gefällt wird. Geringe Anteile der B_{12}-bindenden Glykoproteine erscheinen aber auch schon bei niedrigeren AS-Konzentrationen im Sediment der jeweiligen Molaritätsstufen. Der Vergleich zwischen den B_{12}-Bindungskapazitäten der einander entsprechenden Fraktionen von Normalserum und CML-Serum zeigt, daß die Bindungskapazität für in vitro gebundenes B_{12} bei CML-Serum um den Faktor 8-12 gegenüber Normalserum erhöht ist (siehe Tabelle 1 und Abbildung 1).

Tabelle I

1. Mischplasma aus Spenderblut (nach Ablauf des Verfallsdatums). Jeweils Mittelwerte aus Dreifachansätzen.

AS-Konz.	Menge (mg)	Impulse/min.	Impulse/mg
1,8-m	27,4	1 522	53
2,0-m	26,0	733	26
2,2-m	31,0	1 068	33
2,4-m	35,7	438	11
2,6-m	34,3	573	15
2,8-m	25,5	785	29
3,0-m	19,0	1 343	68
3,2-m	18,9	2 956	153
3,4-m	12,5	5 461	432
3,6-m	6,6	3 673	548

Nulleffekt: 58 Impulse/min.

Für die Berechnung der Impulsrate/mg wurde der Nulleffekt von der Impulsrate/min. subtrahiert.

2. Mischplasma von fünf CML-Patienten

AS-Konz.	Menge (mg)	Impulse/min.	Impulse/mg
1,8-m	30,6	8 719	3o6
2,0-m	26,9	13 342	494
2,2-m	27,7	15 118	541
2,4-m	37,3	25 828	692
2,6-m	32,0	31 806	961
2,8-m	20,5	21 189	1 031
3,0-m	24,0	46 751	1 943
3,2-m	22,0	88 100	4 001
3,4-m	11,6	59 248	5 103
3,6-m	10,8	64 886	6(030

Nulleffekt: 54 Impulse/min.
Impulsrate der Standardlösung (50 nCi $^{57}CoB_{12}$ in 4 ml Wasser): 70 728 Impulse/min.
Für die Sedimente "7c" bis "10c" ergaben sich damit folgende Mittelwerte für die $^{57}CoB_{12}$-Bindungskapazität pro mg Substanz:

Sediment	Normalserum	CML-Serum
7c	0,04 ng B_{12}	1,37 ng B_{12}
8c	0,10 ng B_{12}	2,82 ng B_{12}
9c	0,31 ng B_{12}	3,60 ng B_{12}
10c	0,38 ng B_{12}	4,24 ng B_{12}

(1 nCi $^{57}CoB_{12}$ entspricht 1 ng $^{57}CoB_{12}$)

B. PAPIERELEKTROPHORESE UND ZUGEHÖRIGE AUTORADIOGRAPHIE

Die Auftrennung der verschiedenen Sedimente mit der Papierelektrophorese ergibt bei CML-Serum und Normalserum im Sediment "7c" noch jeweils drei Fraktionen, im Sediment "9c" nur noch jeweils zwei. Im zugehörigen Autoradiogramm zeigt jedoch nur eine Fraktion des CML-Serums eine deutlich sichtbare Schwärzung (siehe Abb. 5). Beim Normalserum ließ sich auch nach fünfmonatiger Expositionszeit keine Schwärzung des Röntgenfilms erzielen, auch nicht bei den

Sedimenten "7c" bis "10c". Das CML-Serum zeigte jedoch bei allen Sedimenten eine deutliche Schwärzung, die am stärksten bei den Sedimenten "7c" bis "10c" hervortrat. Schon nach zwei Monaten waren in einem Kontrollversuch bei den CML-Sedimenten deutliche Schwärzungen des Röntgenfilms zu sehen. Legt man die oben ermittelten B_{12}-Bindungskapazitäten pro mg Substanz zugrunde, so hätte sich bei den Normalsedimenten nach fünfmonatiger Exposition eine Schwärzung zeigen müssen, da gleiche Substanzmengen auf die Papierelektrophoresestreifen aufgetragen worden waren. Theoretisch hätte sich bei den Normalsedimenten eine etwa 1/4 so starke Schwärzung zeigen müssen wie bei den CML-Sedimenten.

C. SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Stellvertretend für die in mehreren Läufen erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 2 und in Abbildung 2 die Daten von Normalsediment "9c", 1. Lauf und von CML-Sediment "9c", 2. Lauf dargestellt.
Die hohe Impulsrate der Gläschen 2-9 von Normalsediment "9c" und der Gläschen 2-9 von CML-Sediment "9c" wurde durch im Überschuß zugegebenes $^{57}CoB_{12}$ hervorgerufen, das, von den auf die Geloberfläche aufgetragenen Proteinlösungen nicht gebunden, zu Beginn der Elution ausgewaschen wurde.
Von Normalsediment "9c" wurden jeweils die Gläschen 19-23, 24-29 und 30-36, von CML-Sediment "9c" jeweils die Gläschen 21-26, 27-32 und 33-36 vereinigt, dialysiert und schrittweise lyophilisiert.
Die Ergebnisse zeigen, daß die normalen B_{12}-bindenden Glykoproteine mit der Säulenchromatographie noch weiter gereinigt wurden, während der Zuwachs an spezifischer Radioaktivität bei den CML-Glykoproteinen gering war.

Tabelle II

Normalsediment "9c", 1. Lauf:

Gläs=chen	Imp. pro 0,4 min.	Gläs=chen	Imp. pro 0,4 min.	Gläs=chen	Imp. pro 0,4 min.
1	53	21	113	41	56
2	3 981	22	157	42	51
3	11 537	23	194	43	47
4	7 035	24	211	44	50
5	2 520	25	238	45	43
6	1 017	26	234	46	37
7	361	27	254	47	38
8	187	28	208	48	31
9	101	29	224	49	34
10	91	30	153	50	32
11	82	31	153	51	30
12	71	32	137	52	34
13	63	33	119	53	31
14	54	34	111	54	27
15	60	35	113	55	31
16	58	36	101	56	38
17	53	37	104	57	29
18	61	38	86	58	27
19	77	39	79		
20	95	40	68		

Nulleffekt: 28 Impulse/0,4 min.

Nachfolgend die aus den verschiedenen Durchläufen stammenden Lyophilisate mit den höchsten B_{12}-Bindungskapazitäten pro mg Substanz.

Sediment	Menge (mg)	Imp./min.	Vitamin B_{12}-Bind. kap./mg
7c	6,7	554	0,11 ng
8c	16,1	2 677	0,26 ng
9c	4,1	2 319	0,87 ng
10c	3,0	900	0,44 ng

Nulleffekt: 74 Impulse/min.

CML-Sediment "9c", 2. Lauf:

Gläs=chen	Imp. pro 0,4 min.	Gläs=chen	Imp. pro 0,4 min.	Gläs=chen	Imp. pro 0,4 min.
1	34	21	275	41	50
2	2 228	22	363	42	48
3	11 111	23	474	43	42
4	6 108	24	547	44	37
5	3 503	25	717	45	33
6	1 348	26	921	46	31
7	532	27	1 731	47	30
8	255	28	2 714	48	32
9	102	29	3 928	49	30
10	84	30	3 668	50	27
11	77	31	2 411	51	29
12	67	32	1 239	52	32
13	58	33	579	53	31
14	61	34	311	54	28
15	69	35	203	55	27
16	71	36	131	56	28
17	83	37	91	57	30
18	86	38	69	58	26
19	91	39	70	59	29
20	138	40	66		

Nulleffekt: 28 Impulse/0,4 min.

Die aus den verschiedenen Durchläufen stammenden Lyophi=lisate mit den höchsten B_{12}-Bindungskapazitäten pro mg Substanz sind nachfolgend aufgeführt.

Sediment	Menge (mg)	Imp./min.	Vitamin B_{12}-Bind. kap./mg
7c	11,1	12 720	1,82 ng
8c	17,8	31 991	2,85 ng
9c	8,3	23 294	4,45 ng
10c	7,6	21 766	4,54 ng

Nulleffekt: 74 Impulse/min.

D. IMMUNELEKTROPHORESE

Die gegen CML-Uroglykoproteine gerichteten Antiseren Nummer 11, 34 und 257 (KALLEE et al. 1964) und Antiserum Karyp. (KARYPIDIS 1966) wurden für die Immunelektrophoresen und die Geldiffusionsteste nach OUCHTERLONY teils einzeln, teils in Kombination miteinander verwendet. Dabei ließen sich mit den Antiseren Nr. 257 und 34 die besten Nativsicheln erzielen, während Antiserum Nr. 11 und Antiserum Karyp. besonders die B_{12}-bindenden Komponenten präzipitierten (vgl. KALLEE et al. 1964).
Mit Antiserum 257 ließen sich aus Normalsediment "9c" zwei Komponenten, aus CML-Sediment "9c" drei Komponenten darstellen. Die beiden Komponenten des Normalserums entsprechen zwei Komponenten des CML-Serums (vgl. Abb. 5 A). Dabei dürfte die langgestreckte Sichel einem Orosomucoid entsprechen. Im zugehörigen Autoradiogramm ließ sich keine Schwärzung des Röntgenfilms erzielen. Mit Antiserum Karyp. ließ sich aus Sediment "10c" sowohl bei Normal- als auch bei CML-Serum jeweils nur eine Komponente darstellen, die im zugehörigen Autoradiogramm eine deutliche Schwärzung aufwies. Das Normalsediment zeigt im Autoradiogramm zusätzlich eine zweite Sichel, die im Nativpräparat nicht zu sehen ist. Es muß sich um ein Spurenprotein mit hoher B_{12}-Bindungskapazität handeln (vgl. Abb. 4 B und C).

E. GELDIFFUSIONSTESTE NACH OUCHTERLONY

Es sollte nun geprüft werden, welche immunologischen Beziehungen zwischen den aus Serum und Urin von Normalpersonen und CML-Patienten isolierten Glykoproteinen bestehen. Insbesondere interessierte die Frage, ob die B_{12}-bindenden Komponenten aus Normalserum und Normalurin mit den B_{12}-bindenden Komponenten aus CML-Serum und CML-Urin identisch sind. Dazu wurden die von KALLEE isolierten CML-Uroglykoproteine der Patienten Bos. und Scha. und die Uroglykoproteine einer Normalperson verwendet. Aus den Abbildungen 5 A und 5 B ist ersichtlich, daß die isolierte

CML-Serumglykoproteinfraktion noch aus mindestens drei verschieden schnell diffundierenden Komponenten besteht, ebenso die Normalserumglykoproteinfraktion. Diese drei Komponenten des Normalserums sind mit den entsprechend schnell diffundierenden Komponenten des CML-Serums identisch. Die Uroglykoproteinfraktion der Normalperson enthält nur eine Komponente, während beide CML-Uroglykoproteinfraktionen aus jeweils mindestens zwei Komponenten bestehen. Die äußeren Komponenten des CML-Serums und des Normalserums sind untereinander und sowohl mit der einzigen Komponente aus Normalurin als auch mit der äußeren Komponente der beiden CML-Urine identisch. Diese äußeren Komponenten der beiden CML-Urine sind wiederum untereinander identisch. Die mittlere Komponente aus CML-Serum und Normalserum ist mit der äußeren Komponente aus den CML-Urinen und der einzigen Komponente aus Normalurin partiell identisch. Daraus geht hervor, daß es sich bei den aus CML-Urin und aus Normalurin isolierten Uroglykoproteinen teilweise um Komponenten handelt, die auch im Serum sowohl von Normalpersonen als auch von CML-Patienten vorkommen.

In Abbildung 5 C (= Autoradiogramm zu 5 B) zeigt sich nur bei den CML-Uroglykoproteinen eine deutliche Schwärzung. Bei den übrigen Glykoproteinen sind nur schwach ausgeprägte Sicheln sichtbar. Der Grund dürfte darin liegen, daß der Überschuß des hinzugefügten $^{60}CoB_{12}$ nicht groß genug war, um das $^{57}CoB_{12}$, das nur eine geringe radiographische Wirkung hat, von seinen Bindungsplätzen zu verdrängen. Die CML-Uroglykoproteine waren schon von Anfang an mit $^{60}CoB_{12}$ abgesättigt, während die Serumglykoproteine zuerst mit $^{57}CoB_{12}$ abgesättigt worden waren, um sie bei der Säulenchromatographie zu identifizieren. Es läßt sich dennoch innen ein durchgehender Ring erkennen.

Deutlicher werden diese Verhältnisse in Abbildung 6 B sichtbar. Daraus geht hervor, daß die B_{12}-bindenden Glykoproteine aus Serum und Urin von Normalpersonen und CML-Patienten untereinander identisch sind, da sich autoradio-

graphisch ein lückenloser Ring darstellt. Beim CML-Patienten Bos. läßt sich hier noch ein zweites langsamer diffundierendes B_{12}-bindendes Glykoprotein darstellen. Das innere schneller diffundierende Glykoprotein ist mit den übrigen B_{12}-bindenden Glykoproteinen identisch. Beim CML-Patienten Scha. kommt ebenfalls ein zweites langsamer diffundierendes B_{12}-bindendes Uroglykoprotein zur Darstellung, das etwas schneller diffundiert als die zweite Komponente beim CML-Patienten Bos.

IV. D I S K U S S I O N

Mit der Methode der fraktionierten Ammonsulfatfällung läßt sich eine hochgradige Anreicherung und Reinigung der Vitamin B_{12}-bindenden Serumglykoproteine erreichen. Mit in vitro hinzugefügten radioaktiv markierten Cyanocobalaminen können die Bindungskapazitäten der einzelnen Serumfraktionen gut bestimmt werden. Nach BERTCHER et al. (1960) sind bei Zimmertemperatur innerhalb von 20-40 Sekunden nach ausreichender B_{12}-Zufuhr die Bindungsplätze in vitro abgesättigt. Da sich bei in vitro und in vivo Versuchen die gleichen Ergebnisse zeigen, nehmen ROSENTHAL et al. (1965) an, daß die in vitro durchgeführten Experimente die natürliche Aufnahme von B_{12} nachahmen. Die von mir erarbeiteten Unterschiede in der Bindungskapazität zwischen Normalserum und CML-Serum stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein (BEARD et al. 1954; MOLLIN et al. 1956), die ebenfalls eine etwa 10-fach höhere B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums gegenüber Normalserum fanden. Die B_{12}-Bindungskapazität ist nur in geringem Maße konzentrationsabhängig (MILLER 1958; BERTCHER et al. 1960; BEAL 1964). BERTCHER et al. (1960) stellten eine erhöhte B_{12}-Bindungskapazität fest, wenn pro ml Serum mehr als 100 ng B_{12} zugegeben wurden. Dies könnte darauf beruhen, daß schon vorher gebundenes, nicht radioaktives B_{12} bei diesen unphysiologisch hohen Konzentrationen von seinen Bindungsplätzen verdrängt und durch radioaktives B_{12} ersetzt wird. KENNEDY u. ADAMS (1967) fanden bei heparinhaltigen Seren in vitro höhere B_{12}-Bindungskapazitäten als bei Seren ohne Heparinzusatz. Andere Koagulationsinhibitoren haben diesen Effekt nicht. B_{12} scheint dabei jedoch nicht an Heparin selbst gebunden zu werden.
Nach fünfmonatiger Expositionszeit der Autoradiogramme der Papierelektrophoresen zeigte sich bei Normalserum keine Schwärzung, obwohl $^{60}CoB_{12}$ verwendet wurde. Dies könnte vielleicht auf einer weniger festen Bindung von B_{12} an Normalglykoproteine beruhen. So könnte gebundenes B_{12}

durch elektrische Ladungsverschiebungen während der Elektrophorese aus Normalglykoproteinen leichter abdiffundieren als aus CML-Glykoproteinen. RETIEF et al. (1967) stellten fest, daß die Bindung des B_{12}-Moleküls an CML-Serumglykoproteine fester ist als an Normalserumglykoproteine, da in CML-Seren der Übergang von B_{12} an normale Retikulozyten im Vergleich zu Normalserum vermindert ist. Durch Säulenchromatographie konnte eine weitere Reinigung der B_{12}-bindenden Glykoproteine erreicht werden. Ob sich mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese eine bessere Reinigung erzielen läßt, scheint noch nicht untersucht zu sein. Es dürfte aber in jedem Falle sinnvoll sein, eine Vorreinigung und Anreicherung der B_{12}-bindenden Glykoproteine mittels fraktionierter Ammonsulfatfällung durchzuführen. Ob sich die B_{12}-bindenden Komponenten jedoch völlig rein darstellen lassen, erscheint fraglich, denn die molekularen Struktureigenschaften von Glykoproteinen sind in hohem Grade von den Aufarbeitungsverfahren abhängig (GOTTSCHALK 1966, 1968).

Aus den Ergebnissen der Geldiffusionsteste nach OUCHTERLONY geht hervor, daß die B_{12}-bindende Komponente aus CML-Serum offenbar identisch ist mit der B_{12}-bindenden Komponente aus Normalserum und aus Normalurin und auch mit einer der beiden B_{12}-bindenden Komponenten aus CML-Urin. Individualspezifitäten der B_{12}-bindenden Glykoproteine ließen sich an den hier untersuchten Glykoproteinen nicht nachweisen. Da sowohl das aufgearbeitete CML-Serum als auch das Normalserum Mischseren waren, aus denen jeweils nur eine B_{12}-bindende Komponente isoliert wurde, erscheint es unwahrscheinlich, daß individualspezifische B_{12}-bindende Glykoproteine überhaupt vorkommen. Ob es sich bei der zusätzlichen B_{12}-bindenden Komponente, die in den CML-Urinen Bos. und Scha. autoradiographisch festgestellt wurde, um ein monoklonales Paraprotein handelt oder um einen Artefakt bei der Reinigungsprozedur, läßt sich nicht entscheiden. Bei diesen Patienten könn-

ten aber möglicherweise beide Transcobalamine, TC I und TC II, präzipitiert worden sein.
Bei meinen Untersuchungen zeigte sich nur ein quantitativer Unterschied in der B_{12}-Bindung zwischen normalem und CML-Transcobalamin. B_{12} wurde in vitro sowohl bei Normalpersonen als auch bei CML-Patienten an das gleiche Protein gebunden. Nach HALL u. FINKLER (1964) soll jedoch in vivo zugeführtes B_{12} bei Normalpersonen an Transcobalamin (=TC) II gebunden werden und nach einiger Zeit an TC I übergehen, während bei CML-Patienten B_{12} gleich an TC I gebunden werden soll.
Die Frage, worauf die vermehrte B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums beruht, läßt sich nach meinen Untersuchungen nicht entscheiden. RETIEF et al. (1967) fanden im Normalserum ein Mengenverhältnis zwischen TC II und TC I von 4:1, bei CML-Serum jedoch von 1:3. Ob allein auf diesem quantitativen Unterschied die erhöhte B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums beruht, läßt sich nicht entscheiden, da die B_{12}-Bindungskapazitäten für jedes der beiden Transcobalamine allein bisher noch unbekannt sind.
Nach SCHMID et al. (1964) wird auch bei manchen anderen chronischen Krankheiten ein saures Alpha-1-Glykoprotein gebildet, das einen verminderten Gehalt an Sialinsäure aufweist. MILLER u. SULLIVAN (1962) fanden bei Veränderungen des Sialinsäuregehaltes das B_{12}-bindende Glykoprotein in seiner Bindungskapazität nicht verändert. KALLEE et al. (1964) dagegen sahen bei Orosomucoid nach Behandlung mit Neuraminidase eine vierfach erhöhte B_{12}-Bindungskapazität. Die von MOSCHIDES et al. (1958) bei CML gefundenen Veränderungen im Hexose-Hexosamin-Stoffwechsel sind sehr wahrscheinlich nicht für die erhöhte B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums verantwortlich, denn diese Veränderungen sind unspezifisch und kommen auch bei anderen Krankheiten vor, die nicht von einer erhöhten B_{12}-Bindungskapazität begleitet sind.
GOTTLIEB et al. (1966) wiesen darauf hin, daß Anomalien

des Philadelphia-Chromosoms (=Ph^1) nicht mit Veränderungen der Alpha-1-Globuline einhergehen. Ph^1-negative Patienten hatten einen normalen Alpha-1-Globulingehalt im Serum. Demzufolge scheint die abnorme B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums nicht Gen-gesteuert zu sein, obwohl bei CML-Patienten eine Anomalie des Philadelphia-Chromosoms vor=liegt.

Direkte Beziehungen zwischen Gesamtleukozytenzahl und B_{12}-Bindungskapazität (BEARD et al. 1954; RACCUGLIA u. SACKS 1957) wurden von anderen Autoren nicht gefunden (MILLER et al. 1957; HALL 1961). Nach RETIEF et al. (1967) soll TC II in den Granulozyten produziert werden.

Über Beziehungen zwischen Intrinsic Factor und den Trans=cobalaminen (WIJMENGA 1950; BRODY et al. 1960; SIMONS 1964; HALL u. FINKLER 1965) läßt sich noch nichts Sicheres aussagen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Ursachen für die erhöhte B_{12}-Bindungskapazität des CML-Serums nicht bekannt sind, daß die B_{12}-bindenden Glykoproteine bei Normalpersonen und CML-Patienten jedoch immunologisch miteinander identisch sein dürften.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels fraktionierter Ammonsulfatfällung bei pH 3,5 ließen sich aus CML-Serum und aus Normalserum Glykoproteinfraktionen isolieren, die säulenchromatographisch noch weiter gereinigt werden konnten. Mit radioaktiv markierten Cyanocobalaminen wurden die Vitamin B_{12}-Bindungskapazitäten der einzelnen Fraktionen bestimmt und die Bindungskapazitäten zwischen Normalserum und CML-Serum verglichen. Der Hauptanteil der B_{12}-bindenden Glykoproteine fiel zwischen 3,0- und 3,6-molarer Ammonsulfatkonzentration aus. CML-Serum band etwa 10-mal mehr Vitamin B_{12} als Normalserum.

Bei immunelektrophoretischen Experimenten und Geldiffusionstesten nach OUCHTERLONY ließen sich in den Glykoproteinfraktionen des CML-Serums drei Komponenten darstellen, die mit drei Komponenten des Normalserums identisch waren. Uroglykoproteine von CML-Patienten und von einer Normalperson waren immunologisch identisch mit Serumglykoproteinen von CML-Patienten und Normalpersonen.

Auch die spezifisch Vitamin B_{12}-bindenden Glykoproteine aus Serum und Urin von CML-Patienten und Normalpersonen erwiesen sich in Autoradiogrammen als immunologisch untereinander identisch.

Herrn Professor Dr. E. KALLEE danke ich besonders herzlich für die Überlassung des Themas und für die Anleitung zu dieser Arbeit. Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. W. CASTRILLON-OBERNDORFER für zahlreiche Literaturhinweise und Herrn Dr. H. GRIMMINGER (beide Isotopenabteilung der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen) für die Anleitung bei den säulenchromatographischen Arbeiten.

VI. L I T E R A T U R

AFSCHAR, A., H. KOPECKI, C. KARYPIDIS, K. ZEININGER und E. KALLEE: Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. III. Mitteilung: ^{57}Co-Vitamin B_{12}-Bindungskapazität des Harns von Normalpersonen. Klin. Wschr. 44, 465 (1966).

ANDERSON, A. J. and N.F. MACLAGAN: Isolation and estimation of urinary mucoproteins. Biochem. J. 59, 638 (1955).

ANDERSON, A.J., E. LOCKEY and N.F. MACLAGAN: Some biological properties of the urinary proteins. Biochem. J. 60, XLI.(1955).

BAKER, H., O. FRANK, S. FEINGOLD and C.M. LEEVY: Vitamin distribution in human plasma proteins. Nature 215, 84 (1967).

BEAL, R.W.: Studies on the plasma protein binding of radioactive vitamin B_{12}. I: Factors influencing in vitro binding. J. Lab. Clin. Med. 63, 969 (1964).

BEAL, R.W.: Preferential in vitro binding of radioactive vitamin B_{12} by an abnormal serum protein in chronic myeloid leukemia. Nature 213, 81 (1967).

BEARD, M.F., W.R. PITNEY and E.H. SANNEMANN: Serum concentrations of vitamin B_{12} in patients suffering from leukemia. Blood 9, 789 (1954).

BENNHOLD, H. und H. OTT: Der Stofftransport. In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, V. Bd./1. Tl., hrsg. von F. BÜCHNER, E. LETTERER u. F. ROULET; Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, p. 167 (1961).

BERTCHER, R.W. and L.M. MEYER: ^{60}Co vitamin B_{12} binding capacity of normal human serum. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 94, 169 (1957).

BERTCHER, R.W., L.M. MEYER, H. VARMUS and C. MULZAC: Some characteristics of binding of vitamin B_{12} by normal human serum. Acta Haemat. 23, 287 (1960).

BLIX, G.: Glycoproteins and glycopeptides in normal human urine. Protides of the Biological Fluids (Proceed. 11th Coll. Bruges, 1963), Elsevier, Amsterdam, p. 303 (1964).

BRODY, E.A., S. ESTREN and L.R. WASSERMAN: The kinetics of intravenously injected radioactive vitamin B_{12}. Studies on normal subjects and patients with chronic myelocytic leukemia and pernicious anemia. Blood 15, 646 (1960).

CASTRILLON-OBERNDORFER, W.L., A. AFSCHAR, C. KARYPIDIS, K. ZEININGER, J. FINKE und E. KALLEE: Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. IV. Mitteilung: ^{57}Co-Cyanocobalamin-Bindungskapazität des Harns bei hämatologischen und einigen anderen internen Krankheiten, sowie bei multipler Sklerose. Acta isotop. (Padova) 9, in Vorbereitung (1969).

CLAUSEN, J. and T. MUNKNER: Calcium and vitamin B_{12} binding to proteins in human serum and cerebrospinal fluid. In vitro experiments. Acta Path. Microbiol. Scand. 54, 129 (1962).

COOPER, B.A.: Studies with a more rapid method of vitamin B_{12} assay utilizing "Euglena Gracilis". J. Clin. Path. 12, 153 (1959).

DISCHE, Z.: Disc. remark in: Protides of the Biological Fluids (Proceed. 11th Coll. Bruges, 1963), Elsevier, Amsterdam, p. 154 (1964).

ERDMANN-OEHLECKER, S.: Der Vitamin B_{12}-Stoffwechsel bei Hämoblastosen. In: Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, I. Europ. Symp. Hamburg 1956, Enke, Stuttgart, p. 456 (1957).

FAHEY, J.L., P.F. McCOY and M. GOULIAN: Chromatography of serum proteins in normal and pathological sera: The distribution of protein bound carbohydrate and cholesterol, sideriophilin, thyroxin-binding protein, B_{12}-binding protein, alkaline and acid phosphatase, radio-iodinated albumin and myeloma proteins. J. Clin. Invest. 37, 273 (1958).

GABUZDA, T.G., J. WORM-PETERSON and P. LOUS: The binding of vitamin B_{12} added in vitro and in vivo to normal human serum proteins separated on ion exchange cellulose. Scand. J. Haemat. 2, 61 (1965).

GOTTLIEB, C.W., F.P. RETIEF, P.W. PRATT and V. HERBERT: Correlation of B_{12} binding proteins with disorders of B_{12} metabolism: Relation to hypo- and hyper-leukocyte states and leukocyte turnover. J. Clin. Invest. 45, 1016 (1966).

GOTTSCHALK, A.: Physico-chemical methods for the determination of the purity, molecular size and shape of glycoproteins. In: A. GOTTSCHALK (Editor) "Glycoproteins", B.B.A. Library, Vol. 5, p. 29, Elsevier, Amsterdam (1966).

GOTTSCHALK, A.: In: "Zur Deutung der Eiweißvehikelfunktion" Internat. Sympos. zum 75. Geburtstag von H. BENNHOLD, Tübingen, 13./14. IX. 1968 (hrsg. v. F.W. ALY, H.J. BRAUN, W.R. HADAM u. E. KALLEE). Arzneim.-Forsch. 18, 1469 (1968).

GROSSOWICZ, D., D. SULITCEANN and D. MERZBACH: Isotopic determination of vitamin B_{12} binding capacity and concentration. Proc. Soc. Exp. Biol. 109,604 (1962).

HALL, C.A.: Plasma vitamin B_{12} removal in myeloproliferative disorders. Clin. Res. 8, 210 (1960).

HALL, C.A.: The plasma disappearance of radioactive vitamin B_{12} in myeloproliferative diseases and other blood disorders. Blood 18, 717 (1961).

HALL, C.A. and A.E. FINKLER: In vivo plasma vitamin B_{12} binding in B_{12} deficient and nondeficient subjects. J. Lab. Clin. Med. 60, 765 (1962).

HALL, C.A. and A.E. FINKLER: A second vitamin B_{12} binding substance in human plasma. Biochim. Biophys. Acta 78, 233 (1963).

HALL, C.A. and A.E. FINKLER: Abnormal transport of vitamin B_{12} in plasma in chronic myelogenous leukaemia. Nature 204, 1207 (1964).

HALL, C.A. and A.E. FINKLER: The dynamics of transcobala-

min II. A vitamin B_{12} binding substance in plasma. J. Lab. Clin. Med. 65, 459 (1965).

HALL, C.A. and A.E. FINKLER: Measurements of the amounts of the individual vitamin B_{12} binding proteins in plasma. Blood 27, 611 (1966).

HALSTED, J.A.: Serum and tissue concentrations of vitamin B_{12} in certain pathological states. New Engl. J. Med. 260, 575 (1960).

HEINRICH, H.C. und H. LAHANN: Physiologie, Pathophysiologie und biochemischer Wirkungsmechanismus der B_{12} Vitamine. Z. Vit.-, Hormon- und Fermentforsch. 5b, 126 (1954).

HEINRICH, H.C. und S. ERDMANN-OEHLECKER: Der Vitamin B_{12}-Stoffwechsel bei Hämoblastosen. II. Die intravitale Bindung der B_{12}-Vitamine an die Serumproteinfraktionen bei Hämoblastosen. Clin. Chim. Acta 1, 311 (1956)

HEINRICH, H.C. und S. ERDMANN-OEHLECKER: Der Vitamin B_{12}-Stoffwechsel bei Hämoblastosen. III. Resorption, Blutverteilung, Serumproteinbindung, Retention und Exkretion der B_{12}-Vitamine bei Hämoblastosen nach oraler und parenteraler B_{12}-Applikation. Clin. Chim. Acta 1, 326 (1956).

HERBERT, V.: Plasma vitamin B_{12} binding protein (abstract). Ann. Intern. Med. 58, 730 (1963).

HERBERT, V., N. DAWBER and S.H. INGBAR: Vitamin B_{12} binding protein in human serum. Clin. Res. 12, 223 (1964).

HOM, B.: Plasma turnover of ^{57}cobalt-vitamin B_{12} bound to Transcobalamin I and II. Scand. J. Haemat. 4, 321 (1967).

HOM, B. and H. OLESEN: Molecular weights of vitamin B_{12} binding proteins in human serum determined by Sephadex G-200 gel filtration. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19, 269 (1967).

HOM, B., H. OLESEN and P. LOUS: Fractionation of vitamin B_{12} binders in human serum. J. Lab. Clin. Med. 68, 958 (1966).

JAWORKOWSKY, L.J. und L.A. MAY: Zum Vitamin B_{12}-Gehalt des Serums bei Leukosen. In: Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, 2. Europ. Sympos. Hamburg 1961, Enke, Stuttgart, p. 559 (1962).

KAHN, P.: Zur klinischen Bedeutung der Vitamin B_{12}-Bestimmung im Serum. Med. Klin. 60, 51 (1965).

KALLEE, E.: In: H. BENNHOLD: Überblick über die Transportfunktion der Serumeiweißkörper. Protides of the Biological Fluids (Proceed. 9^{th} Coll. Bruges 1961), Elsevier, Amsterdam p. 59 (1962).

KALLEE, E., W.L. CASTRILLON-OBERNDORFER, U. FEINE und J. FINKE: Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. IV. Mitteilung: ^{57}Co-Cyanocobalamin-Bindungskapazität des Harns bei einigen Blutkrankheiten und bei multiplen Sklerosen. Klin. Wschr. 44, 845 (1966).

KALLEE, E., S. DEBIASI, C. KARYPIDIS, K. HEIDE und H.G. SCHWICK: ^{60}Co-Vitamin B_{12} bindende Glykoproteine. I. Mitteilung: Anreicherung und Charakterisierung ^{60}Co-Cyanocobalamin-bindender Glykoproteine aus Leukämikerharn und Normalharn. Acta Isotop. (Padova) 4, 103 (1964).

KARYPIDIS, C.: Über Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. Anreicherung und Charakterisierung Radio-Cyanocobalamin-bindender Glykoproteine aus Leukämikerharn, Normalharn, Leukozytenextrakten und Spermalplasma. Inaug. Diss., Tübingen (1966).

KARYPIDIS, C., E. KALLEE und K. ZEININGER: Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. II. Mitteilung: Methode zur Bestimmung der Cyanocobalamin-Bindungskapazität des Urins. Klin. Wschr. 44, 467 (1966).

KENNEDY, E.H. and J.F. ADAMS: The effect of anticoagulants on the in vitro binding capacity of serum and plasma for cobalamins. Scand. J. Haemat. 4, 489 (1967).

KURLOV, O.V.: Disturbance of vitamin B_{12} metabolism in leukemia. Klin. Med. Moskva 8, 42 (1961).

LAU, K.-S., C. GOTTLIEB, L.R. WASSERMAN and V. HERBERT:

Measurement of serum vitamin B_{12} level using radio=isotope dilution and coated charcoal. Blood 26, 202 (1965).

LAWRENCE, C.: The binding of vitamin B_{12} by serum pro=teins in normal and B_{12} deficient subjects. Brit. J. Haemat. 12, 569 (1966).

LINDSTRAND, K., K. STAHLBERG, G. EHRENSVARD and A. NOR=DEN: Studies on free and serum protein-bound vita=min B_{12} by the use of Sephadex G-25 and high vol=tage electrophoresis. Acta Med. Scand. 173, 605 (1963).

LOHSS, F.: Über qualitativ abnorme Serum- und Urinpro=teine. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 66, 398 (1960).

MACLAGAN, N.F. and A.J. ANDERSON: Colloidal properties of urinary mucopolysaccharides. In: Chemistry and Bio=logy of Mucopolysaccharides (Ciba Found. Sympos. 1957), Churchill, London, p. 268 (1958).

MEHL, J.W., J. HUMPHREY and R.J. WINZLER: Mucoproteins of human plasma. III. Electrophoretic studies of muco=proteins from perchloric acid filtrates of plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 72, 106 (1949).

MENDELSOHN, R.S., D.M. WATKIN, A.P. HORBETT and J.L. FAHEY: Identification of the vitamin B_{12}-binding protein in the serum of normals and of patients with chronic myelocytic leukemia. Blood 13, 740 (1958).

MEYER, L.M.: Studies on serum binding of vitamin B_{12} ; mechanism and clinical implications. Ser. Haemat. 3, 91 (1965).

MEYER, L.M., R.W. BERTCHER and E.P. CRONKITE: Serum ^{60}Co Vitamin B_{12} binding capacity in some haematologic disorders. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 360 (1957).

MEYER, L.M., P.G. REIZENSTEIN, E.P. CRONKITE, I.F. MILLER and C.W. MULZAC: Serum binding of vitamin B_{12} ana=logues: Identification of binding groups in the

B_{12} molecule. Brit. J. Haemat. 9, 158 (1959).

MILLER, A.: The in vitro binding of cobalt^{60} labelled vitamin B_{12} by normal and leukemic sera. J. Clin. Invest. 37, 556 (1958).

MILLER, A. and J.F. SULLIVAN: Excretion of a vitamin B_{12} binding substance in chronic myelogenous leukemic urine. Clin. Res. 7, 209 (1959).

MILLER, A. and J.F. SULLIVAN: Electrophoretic studies of the vitamin B_{12} binding protein of normal and chro= nic myelogenous leukemia serum. J. Clin. Invest. 38, 2 135 (1959).

MILLER, A. and J.F. SULLIVAN: Effect of sialidase on the vitamin B_{12} binding protein of human and chicken plasma. In: Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, 2. Europ. Sympos. Hamburg 1961 (hrsg. v. H.C. HEIN= RICH), Enke, Stuttgart, p. 418 (1962).

MILLER, A., H.F. CORBUS and J.F. SULLIVAN: The plasma disappearance, excretion and tissue distribution of cobalt^{60} labelled vitamin B_{12} in normal sub= jects and patients with chronic myelogenous leu= kemia. J. Clin. Invest. 36, 18 (1957).

MOLLIN, D.L.: Radioactive vitamin B_{12} in the study of blood diseases. Brit. Med. Bull. 15, 8 (1959).

MOLLIN, D.L. and G.I.M. ROSS: The vitamin B_{12} concentra= tions of serum and urine of normals and of patients with megaloblastic anaemias and other diseases. J. Clin. Path. 5, 129, (1952).

MOLLIN, D.L. and G.I.M. ROSS: Serum vitamin B_{12} concen= tration in leukemia and in some other haematologi= cal conditions. Brit. J. Haemat. 1, 155 (1955).

MOLLIN, D.L. and C.C. BOOTH: The plasma clearance of in= travenous doses of radioactive vitamin B_{12}. Haemat. Lat. 2, 257 (1959).

MOLLIN, D.L., W.R. PITNEY, S.J. BAKER and J.E. BRADLEY: The plasma clearance and urinary excretion of parenterally administered $^{58}CoB_{12}$. Blood 11, 31 (1956).

MOSCHIDES, E., M. STEFANINI, S.J. MAGALINI and S.A. KISTNER: Content and composition of the mucoprotein fraction of human serum (seromucoid) in diseases with special reference to hematologic disorders. J. Clin. Invest. 37, 127 (1958).

OSTROWSKI, W., B. SKARCYNSKI and Z. ZAK: Vitamin B_{12} in the protein fractions of human blood serum. Bull. Acad. Pol. Sci. 2, 9 (1954).

PITNEY, W.R., M.F. BEARD and E.J. VAN LOON: Observations on the bound form of vitamin B_{12} in human serum. J. Biol. Chem. 207, 143 (1954).

RACCUGLIA, G. and M.S. SACKS: Vitamin B_{12} binding capacity of normal and leukemic sera. J. Lab. Clin. Med. 50, 69 (1957).

RACHMILEWITZ, M., G. IZAK, A. HOCHMAN, J. ARONOVITCH and N. CROSSOWICZ: Serum vitamin B_{12} in leukemias and malignant lymphomas. Blood 12, 804 (1957).

RETIEF, F.P., C.W. GOTTLIEB and V. HERBERT: Binding of B_{12} by human serum, alpha- in preference to beta-globulin. Clin. Res. 14, 325 (1966).

RETIEF, F.P., C.W. GOTTLIEB and V. HERBERT: Delivery of $^{57}CoB_{12}$ to erythrocytes from alpha- and beta- globulin of normal, B_{12}-deficient, and chronic myeloid leukemia serum. Blood 29, 837 (1967).

RETIEF, F.P., C.W. GOTTLIEB, S. KOCHWA, L.R. WASSERMAN and V. HERBERT: Unsaturated B_{12} binding capacity ($UB_{12}BC$) of serum in diagnosis of chronic myelogenous leukemia. Clin. Res. 13, 542 (1965).

RETIEF, F.P., C.W. GOTTLIEB, S. KOCHWA, P.W. PRATT and V. HERBERT: Separation of vitamin B_{12} binding proteins of serum, gastric juice and saliva by rapid DEAE cellulose chromatography. Blood 29, 501 (1967).

RITZ, N.D. and L.M. MEYER: Clearance of intravenously injected radioactive cobalt labelled vitamin B_{12} in chronic myeloid leukemia. Cancer 13, 1000 (1960)

ROSENTHAL, H.L., P.R. MYERS and G. O'BRIEN: The determination of serum vitamin B_{12} binding capacity. In:

Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, 2. Europ. Sympos. Hamburg 1961 (hrsg. v. H.C. HEINRICH), Enke, Stuttgart, p. 410 (1962).

ROSENTHAL, H.L., I.E. HAESSLER and P.C. HILL: The resolution of multiple cyanocobalamin binding components in serum. Biochim. Biophys. Acta 104, 46 (1965).

ROSS, G.I.M.: Vitamin B_{12} in body fluids. Nature 166,270 (1950).

SCHEURLEN, P.G.: Differenzierung der Harnproteine mit der Stärkegel-Elektrophorese. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 67, 329 (1961).

SCHMID, K., J.F. BURKE, M. DEBRAY-SACHS and K. TOKITA: Sialic acid deficient alpha-1-acid glycoprotein produced in certain pathological states. Nature 204, 75 (1964).

SCHULTZE, H.E.: Neue Glykoproteine und ihre Klassifizierung. In: Protides of the Biological Fluids (Proceed. 11^{th} Coll. Bruges 1963), Elsevier, Amsterdam, p. 288 (1964).

SIMONS, K.: Vitamin B_{12} binders in body fluids and blood cells. Soc. Sci. Fenn., Comment. Biol. XXVII. 5, Helsingfors (1964).

SIMONS, K. and T. WEBER: The vitamin B_{12} binding protein in human leukocytes. Biochim. Biophys. Acta 117, 201 (1966).

THOMAS, J.W. and B.B. ANDERSON: Vitamin B_{12} content of normal and leukaemic leukocytes. Brit. J. Haemat. 2, 41 (1956).

WEIMER, H.E., J.W. MEHL and R.J. WINZLER: Studies on the mucoproteins of human plasma. V: Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. J. Biol. Chem. 185, 561 (1950).

WEINSTEIN, I.B. and D.M. WATKIN: $Co^{58}B_{12}$ absorption, plasma transport and excretion in patients with myeloproliferative disorders, solid tumors and nonneoplastic diseases. J. Clin. Invest. 39, 1 667 (1960).

WEINSTEIN, I.B., S.M. WEISSMAN and D.M. WATKIN: The plasma vitamin B_{12} binding substance. I. Its detection in the seromucoid fraction of plasma from normal subjects and patients with chronic myelocytic leukemia. J. Clin. Invest. 38, 1 904 (1959).

WIJMENGA, H.G.: Intrinsic factor and vitamin B_{12} binding substances. Purification, properties and possible relationship. In: Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor, 1. Europ. Sympos. Hamburg 1956, Enke Stuttgart, p. 156 (1957).

WINZLER, R.J.: Glycoproteins. In: The plasma proteins, vol. I. p. 309, (F.W. PUTNAM Editor), Academic Press, New York (1960).

A N H A N G

Abb. 1....6

Abb.1

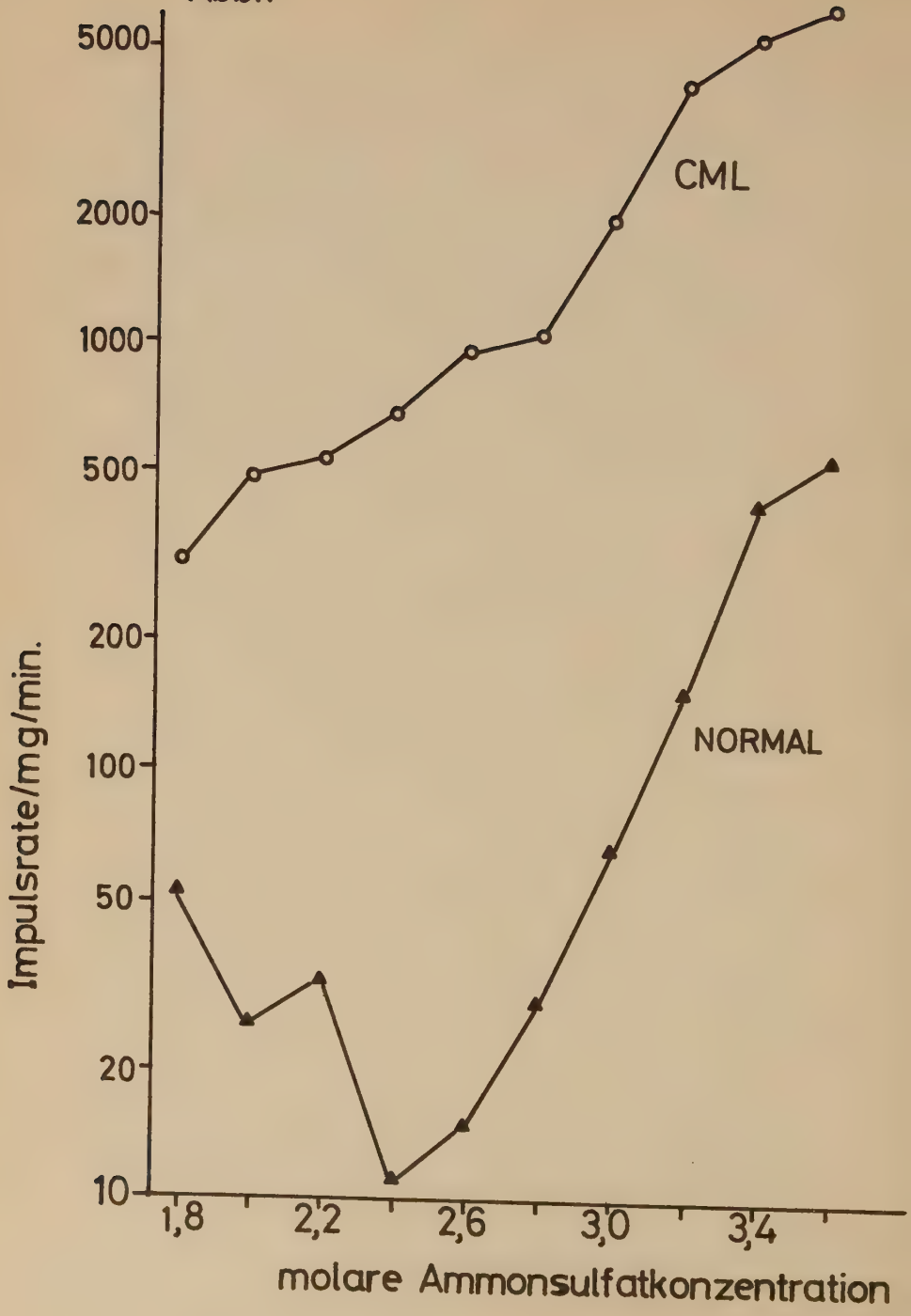

5000
2000
1000
500
200
100
50
20
10
CML
NORMAL
Impulsrate/mg/min.
1,8
2,2
2,6
3,0
3,4
molare Ammonsulfatkonzentration

Abb. 1: FRAKTIONIERTE AMMONSULFATFÄLLUNG

Mischplasma von Normalpersonen und Mischplasma von CML-Patienten wurde schrittweise von 1,8- bis 3,6-m-Ammonsulfatkonzentration bei pH 3,5 gefällt. Nach dem Dialysieren und Lyophilisieren wurden die Impulsraten der Trockensubstanzen der einzelnen Fraktionen gemessen und nach Abzug des Nulleffektes auf jeweils 1 mg Substanz bezogen.
Da die Meßzeit jeweils nur eine Minute betrug und der Nulleffekt bei ca. 60 Impulsen/min. lag, kann das Radioaktivitätsminimum im Bereich der Normalserumfraktionen von 2,0- bis 2,8-m-Ammonsulfatkonzentration nicht als signifikant betrachtet werden. Dagegen liegt die Bindungskurve der CML-Serumproteine eindeutig etwa zehnmal höher als die der Normalserumproteine.

Ordinate logarithmisch unterteilt.

Abb. 2: SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG DER VORGEREINIGTEN GLYKOPROTEINE

Sowohl von Normalserum als auch von CML-Serum wurden hier die Fraktionen "7c" bis "10c" der Ammonsulfatfällung verwendet.
Als repräsentatives Beispiel sind die Ergebnisse bei Normalsediment "9c", 1. Lauf und bei CML-Sediment "9c", 2. Lauf dargestellt.
Die Eluate wurden automatisch in 5 ml-Portionen gesammelt und die Impulsraten der Gläscheninhalte/0,4 min. bestimmt.
Die Lyophilisate der Gläscheninhalte mit den höchsten Vitamin B_{12}-Bindungskapazitäten dienten als Antigene bei den nachfolgenden Immunelektrophoresen und Geldiffusionstesten nach OUCHTERLONY.

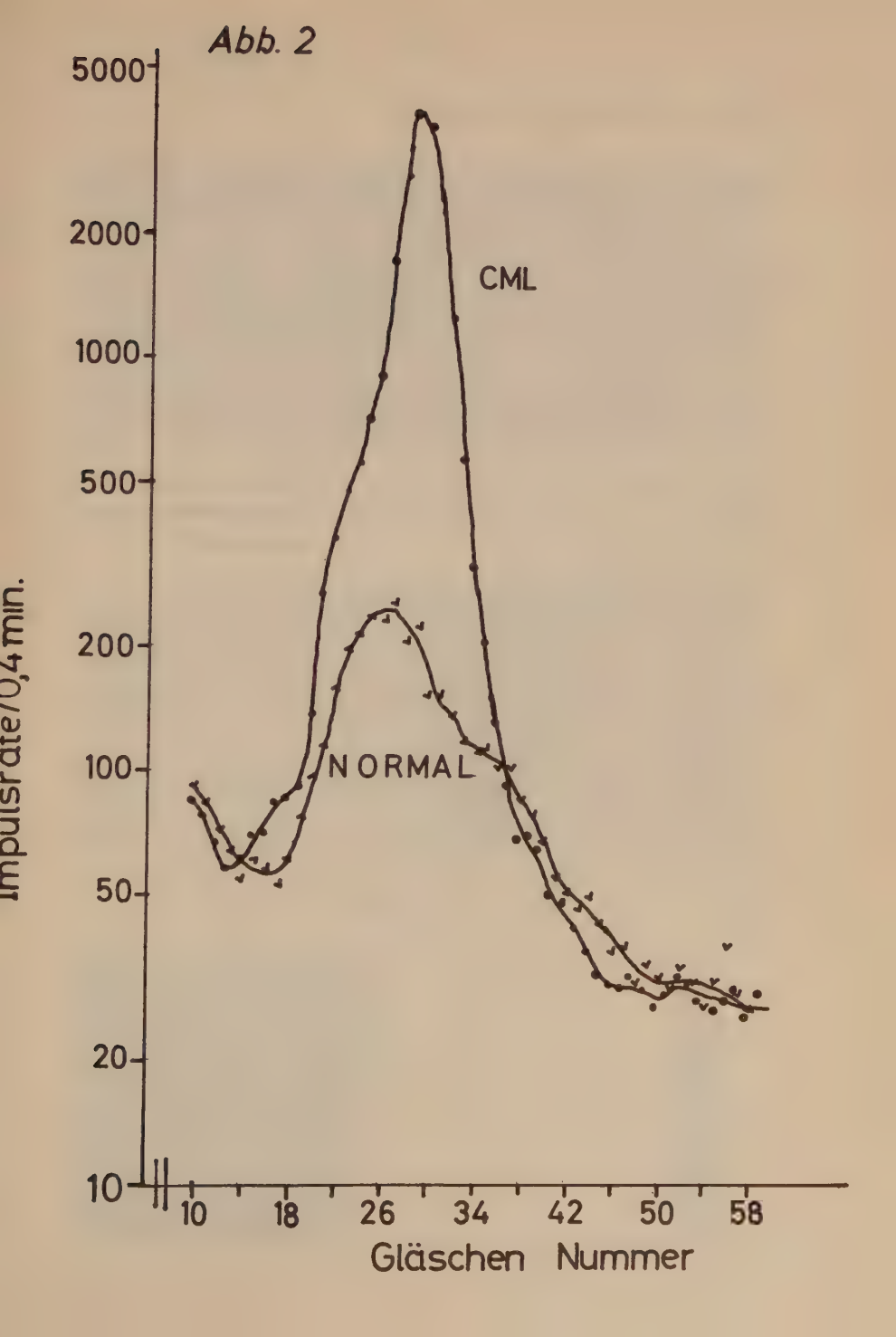


Abb. 2
5000
2000
1000
500
200
100
50
20
10
Impulsrate/0,4 min.
CML
NORMAL
10
18
26
34
42
50
58
Gläschen Nummer

Abb. 3: PAPIERELEKTROPHORESEN

A) Papierelektrophorese der Normalserumfraktion "9c". Diese Fraktion besteht noch aus zwei, mit Amidoschwarz 10 B anfärbbaren Komponenten.

B) Papierelektrophorese der CML-Serumfraktion "9c". Diese Fraktion besteht ebenfalls noch aus zwei Komponenten.

Da bei diesen Versuchen kein Albumin zugefügt werden konnte, war eine Überprüfung der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine mit Hilfe von Bromphenolblau während des Laufes nicht möglich. Infolgedessen kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob sich die Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine von A und B deutlich unterscheiden.

C) Autoradiogramm zu B.
Die Bindungskapazität der Glykoproteine wurde mit $^{60}CoB_{12}$ abgesättigt. Die helle Bande entspricht dem Bereich der B_{12}-bindenden Glykoproteine, der jedoch nicht von dem Wanderungsbereich des freien B_{12} abgetrennt werden kann.
Autoradiographisch läßt sich nicht entscheiden, ob beide, in Abb. 3 B dargestellten Komponenten, B_{12} binden.

Bei den Normalsedimenten ließ sich keine Schwärzung des Röntgenfilms erzielen, auch nicht nach fünfmonatiger Expositionszeit. Bei den CML-Sedimenten hingegen zeigte sich bereits nach zwei Monaten eine deutliche Schwärzung.

Abb. 3

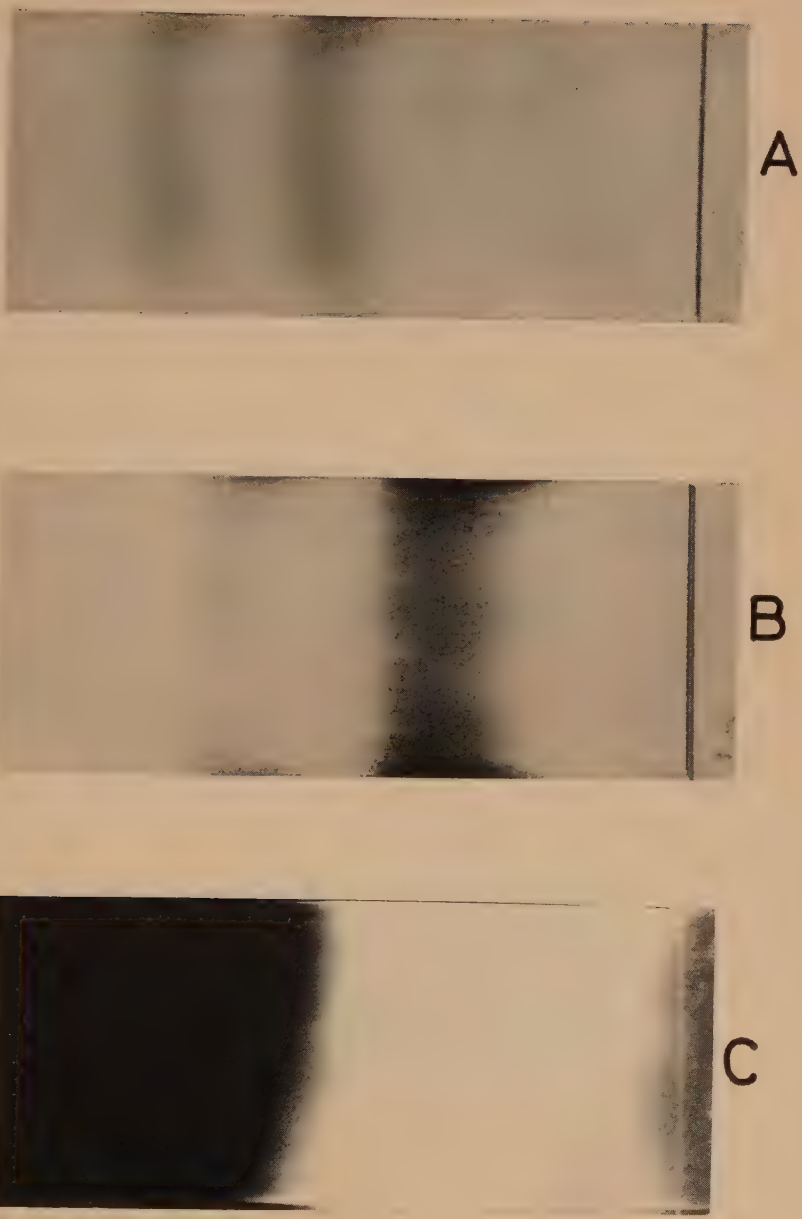
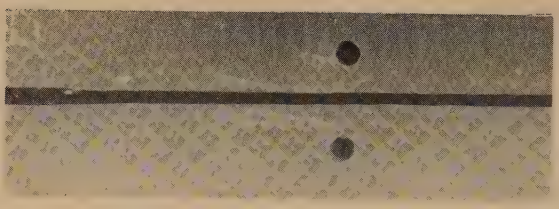
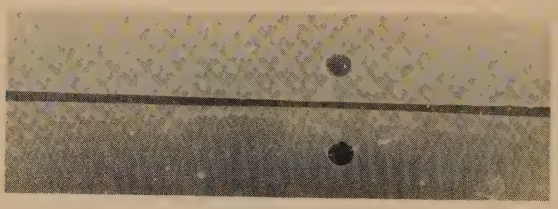


Abb. 4





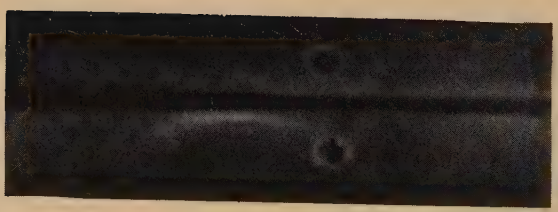


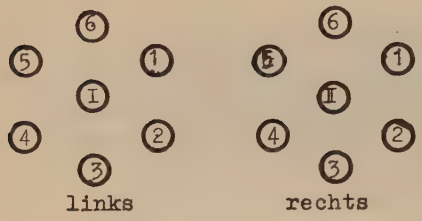
Abb. 4: IMMUNELEKTROPHORESEN

A) a = Normalserumfraktion "9c"
b = Antiserum Nr. 257
c = CML-Serumfraktion "9c"
Die Normalserumfraktion besteht immunelektrophoretisch wahrscheinlich aus mindestens zwei Komponenten, die CML-Serumfraktion wahrscheinlich mindestens aus drei.

B) a = Normalserumfraktion "10c"
b = Antiserum Karyp.
c = CML-Serumfraktion "10c"
Mit Antiserum Karyp. läßt sich sowohl bei Normalserumfraktion "10c" als auch bei CML-Serumfraktion "10c" jeweils nur eine Komponente präzipitieren.

C) Autoradiogramm zu Abb. 4 B.
In der Normalserumfraktion "10c" läßt sich hier eine zweite B_{12}-bindende Komponente darstellen, die im Nativpräparat nicht sichtbar ist. Es dürfte sich um ein Spurenprotein mit hoher B_{12}-Bindungskapazität handeln.

Abb. 5: GELDIFFUSIONSTESTE NACH OUCHTERLONY



A) links und rechts gleiche Antigene

1 = Normalserumglykoprotein
2 = Normal-Uroglykoprotein Kal.
3 = CML-Serumglykoprotein
4 = CML-Uroglykoprotein Scha.
5 = CML-Uroglykoprotein Bos.
6 = CML-Serumglykoprotein

I = Antiserumkomb. Nr. 11+Karyp.
II = Antiserumkomb. Nr. 11 + 257 + Karyp.

Mit der Antiserumkombination Nr. 11 + Karyp. ließen sich nur verschwommene Nativsicheln erzielen. Mit der Antiserumkombination Nr. 11 + 257 + Karyp. ließen sich sowohl beim Normalglykoprotein als auch beim CML-Serumglykoprotein jeweils drei Komponenten darstellen, bei den Uroglykoproteinen jeweils nur eine. Die drei Komponenten des Normalserumglykoproteins sind mit den drei Komponenten des CML-Serumglykoproteins identisch. Die äußere der drei Komponenten ist sowohl mit der einzigen Komponente des Normaluroglykoproteins als auch mit derjenigen der untereinander identischen CML-Uroglykoproteine identisch. Die mittlere Komponente der Serumglykoproteine ist mit der jeweils einzigen Komponente der Uroglykoproteine partiell identisch. Die innere Komponente liefert Unabhängigkeitsreaktionen mit den Uroglykoproteinen.

B) links: Antigene 1-6 wie bei A.

rechts:

1 = Normalvollserum
2 = CML-Vollserum Bos.
3 = CML-Vollserum Seeg.
4 = CML-Vollserum Scha.
5 = CML-Vollserum Rai.
6 = Humanalbumin

I = II = Antiserumkombination Nr. 257 + Karyp.

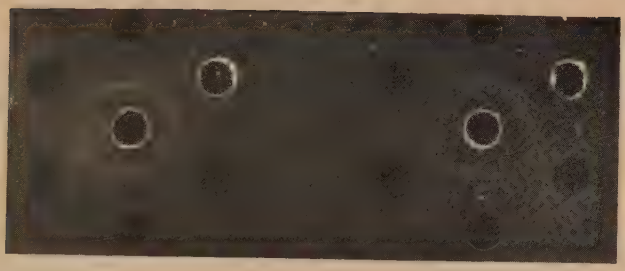
Die immunologischen Beziehungen der Glykoproteine aus Serum und Urin von Normalpersonen und CML-Patienten untereinander zeigen sich in Abb. 5 B links deutlicher als in Abb. 5 A rechts. Es gilt das zu Abb. 5 A Gesagte. In Abb. 5 B rechts wird deutlich, daß die Antiseren keine Antikörper gegen Humanalbumin enthalten, das ja auch, allerdings unspezifisch, Vitamin B_{12} bindet.

C) Im Autoradiogramm zu 5 B läßt sich nur bei den CML-Uroglykoproteinen jeweils eine B_{12}-bindende Komponente nachweisen. Die Sicheln bei den übrigen Glykoproteinen sind wahrscheinlich deswegen so schwach ausgebildet, weil diese Glykoproteine vor der Säulenchromatographie bereits mit autoradiographisch weniger wirksamem $^{57}CoB_{12}$ abgesättigt worden waren und dieses bei der späteren Inkubation mit $^{60}CoB_{12}$ nicht mehr von seinen Bindungsplätzen verdrängt werden konnte.

Abb.5

links rechts

A



B

C

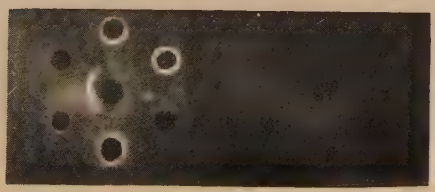


Abb. 6

links rechts

A

B

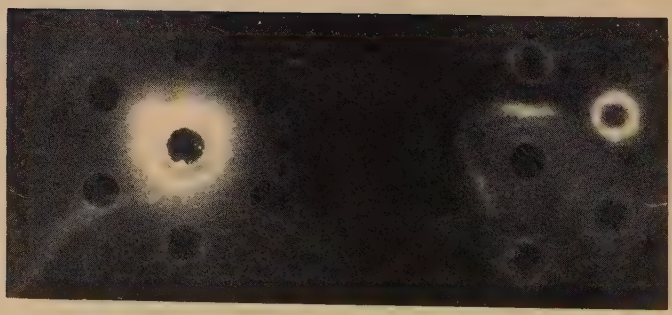
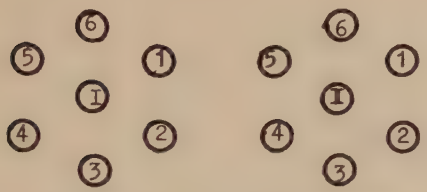


Abb. 6: GELDIFFUSIONSTESTE NACH OUCHTERLONY



LINKS RECHTS

1: Normalserumglykoprotein
2: Normaluroglykoprotein Kal.
3: CML-Serumglykoprotein
4: CML-Uroglykoprotein Scha.
5: CML-Uroglykoprotein Bos.
6: CML-Serumglykoprotein

1: Normalvollserum
2: CML-Vollserum Bos.
3: Normalvollserum 1:2 verdünnt
4: CML-Vollserum Bos. 1:2 verdünnt
5: Humanalbumin
6: CML-Vollserum Seeg.

links rechts

I = II = Antiserum Karyp.

A) Mit Antiserum Karyp. läßt sich nur bei den Vollseren jeweils eine einzige Komponente darstellen. Die Nativ=sicheln der Glykoproteinfraktionen sind kaum zu erken=nen.

B) Autoradiogramm zu A

Mit Antiserum Karyp. lassen sich die B_{12}-bindenden Komponenten am besten präzipitieren. Bei den Normal=glykoproteinen aus Serum und Urin sowie beim CML-Serumglykoprotein läßt sich jeweils nur eine B_{12}-bin=dende Komponente darstellen. Diese Komponenten sind untereinander identisch. Bei den CML-Uroglykoproteinen lassen sich jeweils zwei Komponenten darstellen, wobei die innere Komponente mit den Komponenten der Serum=glykoproteine und des Normaluroglykoproteins identisch ist. Die zweiten B_{12}-bindenden Komponenten der CML-Uroglykoproteine sind untereinander nicht völlig iden=tisch, da sie verschieden schnell diffundieren. Rechts stellt sich nur bei den CML-Vollseren jeweils eine B_{12}-bindende Komponente dar.

Lebenslauf

Am 16. Januar 1943 wurde ich, Gerd Haffner, als zweites Kind des damaligen Kandidaten der Medizin Werner Haffner und seiner Ehefrau Magda, geb. Ries, in Speyer/Rhein geboren. Nach dem Besuch der Volksschulen in Waldmohr/Pfalz und in Landstuhl/Pfalz wechselte ich auf das Staatl. Math.-Naturw. Gymnasium zu Landstuhl über; dort legte ich im März 1963 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1963 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen, wo ich im Oktober 1965 die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach den ersten beiden klinischen Semestern an der Universität München setzte ich das Studium an der Universität Tübingen fort und legte im Februar 1969 das Medizinische Staatsexamen ab.